变形假单胞菌 2-酮基葡萄糖酸转运蛋白基因的克隆与分析

孙文敬[1,2]，栾方[1]，王大明[2,3]，张晓飞[1]，崔凤杰[1,2]，李运哲[1]
(1.江苏大学食品与生物工程学院，江苏镇江 212013)
(2.百勤昇 VC 钠有限公司，江西德兴 334221)(3.江南大学生物工程学院，江苏无锡 214122)

摘要：该研究旨在克隆变形假单胞菌 JUIM01 的 2-酮基葡萄糖酸转运蛋白基因 *kguT*，并明确其基本的生物学信息。根据已报道的假单胞菌的基因组信息及其 2-酮基葡萄糖酸操纵子的物理图谱设计简并引物，采用 TD-PCR 技术从变形假单胞菌中克隆到全长为 1278 bp 的 *kguT*，其核苷酸序列与 *Pseudomonas* sp. CCOS191 的编码 2-酮基葡萄糖酸转运蛋白(KguT)的核苷酸序列的一致性为 87%，编码一个由 425 个氨基酸残基组成的蛋白。该蛋白与 *Pseudomonas* sp. M1 的 KguT 在氨基酸序列上的一致性达 90%，定位于细胞膜，是一个具有 12 个跨膜结构的疏水性的跨膜蛋白，无信号肽，其二级结构中 α 螺旋、延伸链和无规卷曲所占的比例分别为 75.76%、2.12% 和 22.12%。本研究首次从 2-酮基葡萄糖酸的工业生产用菌中克隆到基因 *kguT*，并对其进行了生物信息学分析，为变形假单胞菌的 KguT 的功能研究奠定了基础。

关键词：变形假单胞菌；2-酮基葡萄糖酸转运蛋白；*kguT* 基因；克隆；生物信息学
文章篇号：1673-9078(2016)6-50-55 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.6.009

Cloning and Bioinformatic Analysis of a 2-Ketogluconate Transporter Gene from *Pseudomonas plecoglossicida*

SUN Wen-jing[1,2], LUAN Fang[1], WANG Da-ming[2,3], ZHANG Xiao-fei[1], CUI Feng-jie[1,2], LI Yun-zhe[1]
(1.School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China) (2.Parchn Sodium Isovitamin C Co. Ltd, Dexing 334221, China)(3. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The gene *kguT* in *Pseudomonas plecoglossicida* JUIM01, encoding a 2-ketogluconate transporter, was cloned to understand its general biological properties. The degenerate primers were designed based on the available genomic information of pseudomonads and physical maps of the 2-ketogluconate utilization operon (*kgu* operon). The entire 1278-bp nucleotide sequence of *kguT* was amplified from strain JUIM01 by touchdown polymerase chain reaction (TD-PCR). The *kguT* gene shared 87% sequence identity with the corresponding gene encoding a 2-ketogluconate transporter (KguT) from *Pseudomonas* sp. CCOS191, and encoded a protein consisting of 425 amino acid residues. This KguT was a hydrophobic transmembrane protein with 12 membrane-spanning domains located in the cell membrane, without a signal peptide, and shared 90% sequence identity with the KguT from *Pseudomonas* sp. M1. The proportions of α-helices, extended strands, and random coils in the secondary structure of KguT were 75.76%, 2.12%, and 22.12%, respectively. Therefore, the *kguT* gene was successfully cloned for the first time from the strain used in industrial production of 2-ketogluconic acid and the corresponding bioinformatics were analyzed. The results of this study may provide a foundation for studying the function of 2-ketogluconate transporter from *Pseudomonas plecoglossicida* JUIM01.

Key words: *Pseudomonas plecoglossicida*; 2-ketogluconate transporter; *kguT* gene; cloning; bioinformatics

2-酮基葡萄糖酸(2-ketogluconic acid, 2KGA)是目前国际上采用发酵工程技术规模化生产的有机酸之一，主要作为食品抗氧化剂 D-异抗坏血酸及其钠盐生产的原料，也可作为水泥增塑剂、饲料添加剂以及洗涤剂和显影剂的重要组份，还可作为除莠化合物、D-核酮糖、D-阿拉伯糖、糠醛及一些杂环化合物合成的前体[1~3]。

能够催化氧化葡萄糖为 2KGA 的细菌较多，最常见的是假单胞菌(*Pseudomonas*)、葡萄糖酸杆菌(*Gluconobacter*)、欧文氏菌(*Erwinia*)、沙雷氏菌

收稿日期：2015-11-28
基金项目：国家自然科学基金项目(31571885)；国家高技术研究发展计划项目(2012AA022103)；江西省科技计划项目(赣知发[2015]64 号)；江苏大学研究生科研创新计划项目(KYXX_0046)；江苏大学大学生科研立项项目(13A083)；德兴市科技计划项目(德科发[2015]44 号)
作者简介：孙文敬（1964-），男，博士，研究员，研究方向为食品生物技术

(*Serratia*)和醋酸菌(*Acetobacter*)等，其中在国际上2KGA 工业生产中得到普遍采用的是假单胞菌[4-5]。在假单胞菌的葡萄糖代谢过程中，葡萄糖在细胞的周质空间首先被膜结合吡咯喹啉醌依赖的葡萄糖脱氢酶催化氧化为葡萄糖酸，然后再被膜结合黄素腺嘌呤二核苷酸依赖的葡萄糖酸脱氢酶催化氧化为 2KGA[2]。在细胞周质空间中形成的2KGA 既可分泌于胞外积累于培养基中，也可被转运至细胞质内磷酸化为 6-磷酸葡萄糖酸进而被进一步分解代谢[6]。因此，如何有效降低发酵目的产物的分解代谢已成为2KGA 发酵生产研究中的重要课题之一。

迄今为止，有关 2KGA 代谢的基因调控研究报道较少，且几乎只涉及到恶臭假单胞菌(*Ps. putida*)和铜绿假单胞菌(*Ps. aeruginosa*) [6~11]。已有研究表明，假单胞菌与2KGA 分解代谢相关的基因均位于染色体上的 *kgu* 操纵子(2-ketogluconate utilization operon, *kgu* operon)中，主要包括 *kguE*、*kguK*、*kguT* 和 *kguD* 等结构基因，分别编码 2KGA 异构酶(KguE)、2KGA 激酶(KguK)、2KGA 转运蛋白(KguT)和 2KGA 还原酶(KguD) [6~7]。

2KGA 的转运是假单胞菌分解代谢的起始步骤，因此有必要了解 KguT 的功能及其调控机制。本研究以国内 2KGA 生产的工业用菌变形假单胞菌 JUIM01 为材料，根据已报道的恶臭假单胞菌和铜绿假单胞菌的 *kgu* 操纵子的物理图谱及相关的基因组信息设计简并引物，利用 TD-PCR 技术分别克隆 *kguT* 的上下游基因（即 *kguK* 和 *kguD*）的保守序列，在此基础上克隆 *kguT* 的全长基因，并对该基因进行相应的生物信息学分析，为后续的 KguT 功能及其调控机制研究奠定基础，进而为 2KGA 高效生产菌株的构建提供重要的理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

变形假单胞菌(*Ps. plecoglossicida*) JUIM01，由本实验室选育保藏；大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109，由本实验室保存；质粒 pMD19-T，购自宝生物工程（大连）有限公司。

1.1.2 培养基

LB 培养基(g/L)：酵母提取物 5.0，胰蛋白胨 10.0，NaCl 10.0，pH 7.0。1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

1.1.3 工具酶和试剂

λ-*Hind* Ⅲ digest DNA Marker、限制性内切酶 *EcoR* Ⅰ、限制性内切酶 *Hind* III 和 DNA A-Tailing Kit，购自宝生物工程（大连）有限公司；2×Pfu MasterMix ，购自天根生化科技（北京）有限公司；Marker D 购自北京赛百盛基因技术有限公司；SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒，购自生工生物（上海）股份有限公司；琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒（离心柱型）和细菌基因组 DNA 提取试剂盒（离心柱型），购自上海捷瑞生物工程有限公司；其它试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 主要仪器设备

C1000 Touch™ 型 PCR 仪、PowerPac Basic 型电泳仪和 GelDocTM XR+型凝胶成像仪，美国 Bio-rad 公司；TGL-18M 型冷冻离心机，上海卢湘仪离心机仪器有限公司；XMTD-8222 型恒温水浴锅，上海精宏实验设备有限公司。

1.3 方法

1.3.1 变形假单胞菌JUIM01基因组DNA的提取

挑取变形假单胞菌 JUIM01 单菌落接种于 25 mL 的 LB 培养基中，30 ℃、200 r/min 培养 16 h 后，取 1 mL 培养液 8000 r/min 离心 2 min 收集菌体，并用无菌水洗涤菌体 2 次，然后用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取变形假单胞菌 JUIM01 的总 DNA。

1.3.2 PCR 引物的设计与合成

根据已报道的铜绿假单胞菌 *kgu* 操纵子的物理图谱[6~7]，结合在 NCBI 数据库中比对到的假单胞菌的相似序列，采用引物设计软件 Primer Premier 5.0 设计简并引物，分别克隆 *kguT* 基因的上下游基因，再根据克隆得到的基因片段设计引物获取 *kguT* 基因的全长片段。引物的合成由生工生物（上海）有限公司完成。

表 1 本研究所用的引物序列

Table 1 Primers used in this study

引物	序列
P1	5′-CAGTTCGGCAAGCGCATHGCNGGNGC-3′
P2	5′-TCGGCAGGCCTTCCATRTCNCC-3′
P3	5′-CTGCAGCTGCTGGTGGARAAYGAYCARA-3′
P4	5′-GGTCGTCGCCCTGCARNGGRTAYTC-3′
P5	5′-CCGAACGGTCGCAGCATCT-3′
P6	5′-GGCACAAGCCATCAGCAG-3′

1.3.3 目的基因片段的扩增

以 JUIM01 菌株的基因组 DNA 为模板，采用引物 P1 和 P2 扩增 *kguT* 上游基因 *kguK* 的部分片段；采用引物 P3 和 P4 扩增 *kguT* 下游基因 *kguD* 的部分片段；

采用引物 P5 和 P6 扩增包含 *kguT* 全长的基因片段。

PCR 反应体系(25.0 μL)：2×Pfu MasterMix 12.5 μL，上游引物(10.0 μmol/L) 1.0 μL，下游引物(10.0 μmol/L) 1.0 μL，基因组 DNA 1.0 μL，ddH_2O 9.5 μL。

PCR 反应程序：94 ℃预变性 3 min；94 ℃变性 30 s，退火 30 s（第 1 个循环的退火温度为 66 ℃，以后每个循环降低 0.5 ℃），72 ℃延伸 1 min/kb，反应 30 个循环；94 ℃变性 30 s，51 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 1 min/kb，反应 10 个循环；72 ℃延伸 5 min。

1.3.4 DNA 的回收、连接及转化

采用 1%琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 扩增产物，再用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收目的基因片段；采用 DNA A-Tailing Kit 对 PCR 产物进行处理后，按照 pMD19-T 试剂盒的使用说明书，将目的片段连接到 pMD19-T 载体上（T-A 克隆），然后转化大肠杆菌 JM109 的感受态细胞；在含有 50 μg/mL 的氨苄青霉素的 LB 平板上筛选阳性单克隆，经酶切鉴定得到重组克隆。DNA 序列的测定委托生工生物（上海）股份有限公司完成。

1.3.5 生物信息学分析

采用 DNAMAN 软件进行核酸和氨基酸序列的分析比对；采用 NCBI 网站中的 BLAST 工具进行核酸和氨基酸序列同源性分析；采用在线软件 NCBI Conserved Domain Search 进行氨基酸保守序列分析；应用 ProtParam 工具对氨基酸序列进行理化性质的预测；应用在线软件 TMHMM 2.0 (http://genome.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0)进行跨膜结构分析；采用在线软件 PSORT Prediction 进行蛋白细胞定位分析；采用在线软件 SignalP 4.0 进行蛋白信号肽预测；应用 Predictprotein 软件进行蛋白质的二级结构分析；采用在线软件 Swiss-Model 进行蛋白质的三级结构分析；利用 MEGE6.0 软件构建蛋白的系统进化树。

2 结果与讨论

2.1 变形假单胞菌 *kguT* 基因的上下游基因保守区的克隆

以本研究提取到的变形假单胞菌 JUIM01 基因组 DNA（图 1）为模板，以 P1 和 P2 为引物进行 PCR 扩增。1%琼脂糖凝胶电泳分析结果（图 2）表明，PCR 扩增产物的大小约为 800 bp；测序结果表明，该基因片段的核苷酸序列长度为 840 bp。利用 BLAST 程序对该序列与 GenBank 中的序列进行同源性比较，发现该片段与 *Pseudomonas* sp. CCOS 1991 的编码 2-脱氧-3-脱氧葡糖酸激酶的核苷酸序列 (GenBank: LN847264.1)一致性达 82%，初步确定该序列为 KguK 编码基因 *kguK* 的保守片段。

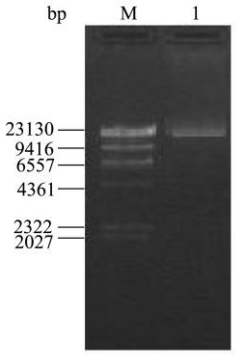

图 1 *Ps. plecoglossicida* JUIM01 基因组 DNA 的电泳分析

Fig.1 Electrophoretic analysis of genomic DNA from *P. plecoglossicida* JUIM01

注：M. DNA Marker；1. 基因组 DNA。

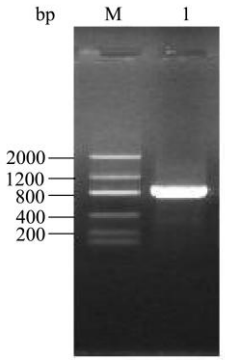

图 2 *Ps. plecoglossicida* JUIM01 的 *kguT* 上游保守区 PCR 扩增产物的电泳分析

Fig.2 Electrophoretic analysis of the PCR product of the upstream conserved region of the *kguT* gene from *P. plecoglossicida* JUIM01

注：M. DNA Marker；1. *kguT* 上游保守区序列。

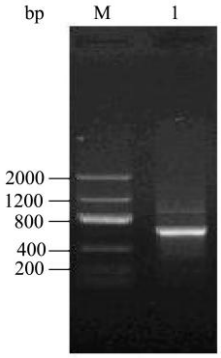

图 3 *Ps. plecoglossicida* JUIM01 的 *kguT* 下游保守区 PCR 扩增产物的电泳分析

Fig.3 Electrophoretic analysis of the PCR product of the downstream conserved region of the *kguT* gene from *P. plecoglossicida* JUIM01

注：M. DNA Marker；1. *kguT* 下游保守区序列。

以 P3 和 P4 为引物进行 PCR 扩增，得到了 600 bp 左右的 PCR 扩增产物（图 3）；测序结果表明，该片段的长度为 613 bp。通过同源性比对发现，该片段与 *Ps. mosselii* SJ10 的编码双乙醛酸/羟基丙酮酸还原酶的核酸序列(GenBank: CP009365.1)一致性为 83%，初步确定该序列为 KguD 编码基因 *kguD* 的保守片段。

2.2 变形假单胞菌 *kguT* 基因片段的克隆

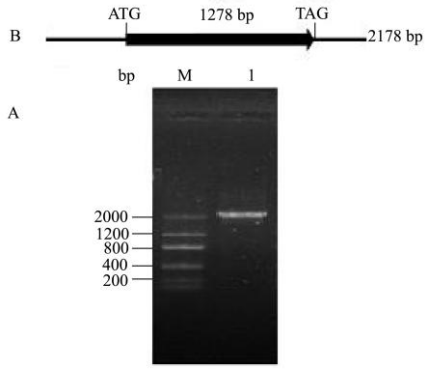

图 4 *Ps. plecoglossicida* JUIM01 *kguT* 基因的克隆

Fig.4 Cloning of the *kguT* gene from *P. plecoglossicida* JUIM01

注：A：包含 *kguT* 基因全长的基因片段的电泳分析；B：扩增到的基因片段，其中包括 *kguT* 基因的完整序列；M. DNA Marker；1. PCR 扩增产物。

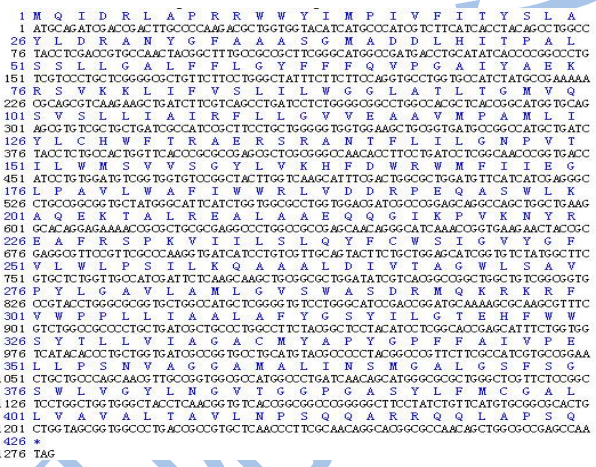

图 5 *Ps. plecoglossicida* JUIM01 的 KguT 的基因序列及其氨基酸序列

Fig.5 Gene and amino acid sequences of KguT from *P. plecoglossicida* JUIM01

以变形假单胞菌 JUIM01 基因组为模板，P5 和 P6 为引物进行 PCR 扩增。1%琼脂糖凝胶电泳分析结果（图 4A）表明，PCR 扩增产物的大小约为 2100 bp；测序结果表明，该基因片段的核苷酸序列长度为 2178 bp。通过 DNAMAN 分析发现，其中含有一个完整的开放阅读框，其起始密码子为 ATG，终止密码子为 TAG，核苷酸序列的长度为 1278 bp（图 4B）。利用 BLAST 进行同源性比对，发现该序列与 *Pseudomonas* sp. CCOS191 的编码 KguT 的核苷酸序列(GenBank: CRI56885.1)的一致性为 87%，初步确定该序列为编码 KguT 的基因序列（图 5）。本研究克隆的变形假单胞菌 JUIM01 的 *kguT* 的核苷酸序列在 Genbank 中的登录号为 KU168042。

2.3 变形假单胞菌 KguT 的生物信息学分析

2.3.1 变形假单胞菌 KguT 的基本理化性质分析

表 2 *Ps. plecoglossicida* JUIM01 KguT 的氨基酸组成

Table 2 Amino acid composition of KguT from *P. plecoglossicida* JUIM01

氨基酸组成	氨基酸数量	在蛋白中的比例/%
A (Ala)	53	12.47
C (Cys)	4	0.94
D (Asp)	9	2.12
E (Glu)	11	2.59
F (Phe)	24	5.65
G (Gly)	33	7.76
H (His)	4	0.94
I (Ile)	27	6.35
K (Lys)	12	2.82
L (Leu)	58	13.65
M (Met)	14	3.29
N (Asn)	8	1.88
P (Pro)	21	4.94
Q (Gln)	15	3.53
R (Arg)	20	4.71
S (Ser)	29	6.82
T (Thr)	13	3.06
V (Val)	32	7.53
W (Trp)	19	4.47
Y (Tyr)	19	4.47

变形假单胞菌 *kguT* 核苷酸序列的 GC 含量为 63.93%，编码一个由 425 个氨基酸残基组成的理论分子质量为 47200 u 的蛋白。该蛋白的理论等电点为 9.53，分子式为 $C_{2231}H_{3397}N_{547}O_{550}S_{18}$，原子总数为 6743，带负电荷的氨基酸残基(Asp+Glu)总数为 20 个，带正电荷的氨基酸残基(Arg+Lys)总数为 32 个。从该蛋白的氨基酸组成（表 2）中可以看出，其中的氨基酸以 Ala 及 Leu 居多（分别占该蛋白氨基酸总数的 12.47%和 13.65%），没有吡咯赖氨酸(Pyl)和硒半胱氨酸(Sec)的存在。该蛋白的不稳定参数为 48.60(>40)，为不稳定蛋白；其亲水性评估为 0.60，脂溶指数为

112.31，为疏水性蛋白。假设所有的半胱氨酸残基形成胱氨酸，则该蛋白的水溶液(1.0 g/L)在 280 nm 处的吸光度为 2.82，摩尔消光系数为 133060 mol^{-1} cm^{-1}；假设所有的半胱氨酸残基被还原，则该蛋白的水溶液(1.0 g/L)在 280 nm 处的吸光度为 2.81，摩尔消光系数为 132810 mol^{-1} cm^{-1}。该蛋白序列的 N-末端为甲硫氨酸(M)，在离体培养的哺乳动物网状细胞中的半衰期为 30 h，在酵母和大肠杆菌中的半衰期分别大于 20 h 和 10 h。

2.3.2 变形假单胞菌 KguT 的氨基酸序列分析

氨基酸序列的保守序列分析结果表明，变形假单胞菌的 KguT 蛋白属于 MFS 转运蛋白超家族，具有底物转运蛋白结构域 (MFS domain)，处于其氨基酸序列的 14-415 位。已有研究表明，MFS 转运蛋白在细胞的物质交换和能量代谢过程中具有重要作用[12]。BLAST 分析结果表明，KguT 的氨基酸序列与 *Pseudomonas* sp. M1 (WP_009622614.1)、*Ps. aeruginosa* (WP_023091797.1) 和 *Ps. putida* (WP_016499836.1) 的 2-酮基葡萄糖酸转运蛋白的氨基酸序列一致性分别为 90%、86%和 86%；与 *Ps. putida* (WP_043210970.1)、*Ps. mosselii* (WP_038706248.1)、*Pseudomonas* sp. NBRC11130 (WP_054886068.1)和 *Ps. fuscovaginae* (WP_054061479.1)的 MFS 转运蛋白的氨基酸序列一致性分别为 97%、93%、88%和 88%。

2.3.3 变形假单胞菌 KguT 的细胞定位、跨膜结构及信号肽预测

利用 PSORT Prediction 和 TMHMM 2.0 进行的预测结果表明，KguT 定位于细胞膜，具有 12 个跨膜结构域，为典型的跨膜蛋白（图略）。利用 SignalP 4.0 进行的预测结果显示，KguT 蛋白不含信号肽（图略）。

2.3.4 变形假单胞菌 KguT 的二级结构

采用 Predictprotein 软件预测了变形假单胞菌 JUIM01 的 KguT 蛋白的二级结构，结果表明：该蛋白的二级结构中包含了 α 螺旋 (alpha helix)、延伸链 (extended strand)和无规卷曲 (random coil) 等 3 种结构形式，各自所占的比例分别为 75.76%、2.12%和 22.12%（图略）。

2.3.5 变形假单胞菌 KguT 的三级结构

利用最常用的蛋白质三级结构预测数据库 Swiss-Model 对变形假单胞菌 JUIM01 的 KguT 的三级结构进行了预测。选取与 KguT 蛋白氨基酸序列一致性为 17.82%的 Glycerol-3-phosphate transporter 作为模板，模拟以单体形式存在的 KguT 的三级结构，结果如图 6 所示。

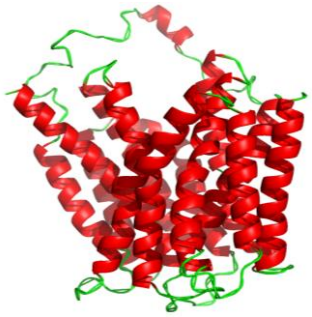

图 6 *Ps. plecoglossicida* JUIM01 蛋白 KguT 的三级结构

Fig.6 Tertiary structure of KguT from *P. plecoglossicida* as predicted by Swiss-model

注：覆盖范围：6 - 413；模型样本：[1pw4.1.A] (3.30 Å)；序列一致性：17.82%。

2.3.6 变形假单胞菌 KguT 的系统进化分析

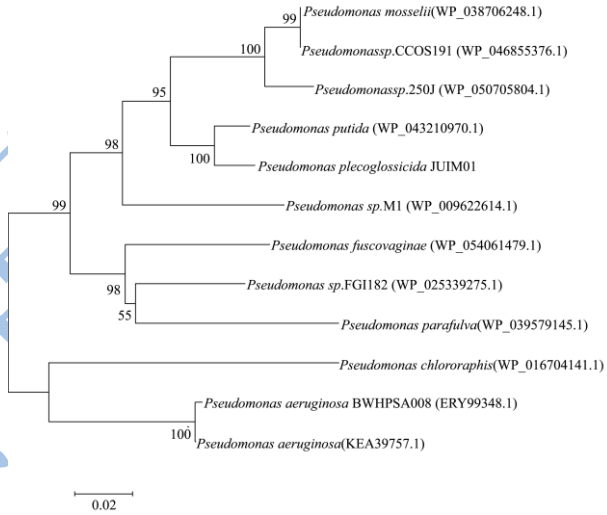

图 7 KguT 蛋白的系统进化树

Fig.7 Phylogenetic tree of related KguT proteins

通过在 NCBI 中对变形假单胞菌 KguT 序列进行 BLAST 搜索，获得了 KguT 的同源序列，然后利用 ClustW 软件进行多序列同源性多重比对，采用 MEGA 6.0 软件对 11 个来源不同的氨基酸序列进行系统进化分析。分析结果（图 7）表明：该蛋白与 *Ps. putida* (WP_043210970.1) KguT 的同源性最高，与 *Pseudomonas* sp. 250J (WP_050705804.1)、*Ps. mosselii* (WP_038706248.1) 和 *Pseudomonas* sp. CCOS191 (WP_046855376.1) KguT 的同源性较高，与 *Ps. chlororaphis* (WP_016704141.1)、*Ps. aeruginosa* BWHPSA008 (ERY99348.1) 和 *Ps. aeruginosa* (KEA39757.1) KguT 的同源性较低。

3 结论

3.1 以文献报道的恶臭假单胞菌和铜绿假单胞菌 *kgu*

操纵子的物理图谱为依据，结合在 NCBI 中比对得到的假单胞菌的相似序列，设计了具有一定特异性的简并引物，成功地从变形假单胞菌 JUIM01 中克隆了 *kguT* 上下游基因的部分片段，分别与 *Pseudomonas* sp. CCOS 1991 2-脱氧-3-脱氧葡糖酸激酶及 *Ps. mosselii* SJ10 双乙醛酸/羟基丙酮酸还原酶编码基因的核苷酸序列一致性为 82%和 83%，可以认为所克隆的片段为变形假单胞菌 *kguK* 与 *kguD* 基因的保守序列。根据获得的 *kguT* 上下游基因保守区的核苷酸序列设计引物，扩增得到了 2178 bp 的基因片段，其中具有一个长度为 1278 bp 的完整的开放阅读框，其序列与 *Pseudomonas* sp. CCOS191 的编码 KguT 的核苷酸序列一致性为 87%，可以认为从变形假单胞菌 JUIM01 中克隆得到的核苷酸序列长度为 1278 bp 的基因为 *kguT* 基因。

3.2 生物信息学分析结果表明：变形假单胞菌的 *kguT* 编码一个由 425 个氨基酸残基组成的蛋白，与本研究所涉及的大多数假单胞菌的 MFS 转运蛋白（包括 KguT）在氨基酸序列上的一致性达 90%左右；该蛋白定位于细胞膜，是一种具有 12 个跨膜结构的疏水性的跨膜蛋白，无信号肽；在该蛋白的二级结构中，α 螺旋、延伸链和无规卷曲所占的比例分别为 75.76%、2.12%和 22.12%。

参考文献

[1] Sun WJ, Zhou YZ, Zhou Q, et al. Semi-continuous production of 2-keto-gluconic acid by *Pseudomonas fluorescens* AR4 from rice starch hydrolysate [J]. Bioresource Technology, 2012, 110: 546-551

[2] Chia M, Nguyen TBV, Choi WJ. DO-stat fed-batch production of 2-keto-D-gluconic acid from cassava using immobilized *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 78(5): 759-765

[3] Stottmeister U, Aurich A, Wilde H, et al. White biotechnology for green chemistry: fermentative 2-oxocarboxylic acids as novel building blocks for subsequent chemical syntheses [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2005, 32: 651-664

[4] Xue Q, Wei Z, Sun WJ, et al. 2-Keto-D-gluconate-yielding membrane-bound D-glucose dehydrogenase from *Arthrobacter globiformis* C224: purification and characterization [J]. Molecules, 2015, 20: 846-862

[5] Yang GF, Wei Z, Sun WJ, et al. Purification and enzymatic characterization of membrane-bound D-gluconate dehydrogenase from *Arthrobacter globiformis* [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2015, 113: 14-22

[6] del Castillo T, Ramos JL, Rodríguez-Herva JJ, et al. Convergent peripheral pathways catalyze initial glucose catabolism in *Pseudomonas putida*: genomic and flux analysis [J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(14): 5142-5152

[7] Swanson BL, Hager P, Jr. Phibbs P, et al. Characterization of the 2-ketogluconate utilization operon in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 [J]. Molecular Microbiology, 2000, 37(3): 561-573

[8] Daddaoua A, Krell T, Alfonso C, et al. Compartmentalized glucose metabolism in *Pseudomonas putida* is controlled by the PtxS repressor [J]. Journal of Bacteriology, 2010, 192(17): 4357-4366

[9] Swanson BL, Hamond AN. Autoregulation of the *Pseudomonas aeruginosa* protein PtxS occurs through a specific operator site within the *ptxS* upstream region [J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(15): 4366-4371

[10] Daddaoua A, Fillet S, Fernández M, et al. Genes for carbon metabolism and the ToxA 1.75 virulence factor in *Pseudomonas aeruginosa* are regulated through molecular interactions of PtxR and PtxS [J]. PloS One, 2012, 7(7): e39390

[11] Pineda-Molina E, Daddaoua A, Krell T, et al. *In situ* X-ray data collection from highly sensitive crystals of *Pseudomonas putida* PtxS in complex with DNA [J]. Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications, 2012, 68: 1307-1310

[12] Pao SS, Paulsen IT, Saier MH. Major facilitator superfamily [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1998, 62(1): 1-34

现代食品科技